

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010487279

WPI Acc No: 1995-388677/*199550*

XRAM Acc No: C95-166888

A transformant prepd. by a synthetic gene of a copolymer and the prepn.
of the copolymer - whereby the transformant is cultured to form a
copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate

Patent Assignee: KANEBUCHI KAGAKU KOGYO KK (KANF)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 7265065	A	19951017	JP 9484084	A	19940329	199550 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9484084 A 19940329

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 7265065	A		9	C12N-001/21	

Abstract (Basic): JP 7265065 A

A transformant prepd. by introducing a vector plasmid contg. a
synthetic gene of a copolymer constituted by 3-hydroxybutyrate and
3-hydroxyhexanoate to a host microbe body. Also claimed is a method for
the prepn. of a copolymer in which the above transformant is cultured
to accumulate a copolymer constituted by 3-hydroxybutyrate and
3-hydroxyhexanoate.

ADVANTAGE - The method can produce the copolymer in a high yield
from oils and fats and fatty acids at low cost.

Dwg.0/0

Title Terms: TRANSFORM; PREPARATION; SYNTHETIC; GENE; COPOLYMER;
PREPARATION; COPOLYMER; TRANSFORM; CULTURE; FORM; COPOLYMER; HYDROXY;
BUTYRATE; HYDROXY; HEXANOATE

Derwent Class: A23; D16

International Patent Class (Main): C12N-001/21

International Patent Class (Additional): C12N-015/09; C12P-007/62;

C12N-001/21; C12R-001-01

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C02; A05-E02; D05-H12E

Polymer Indexing (PS):

<01>

001 017; G3758 P0599 D01 D11 D10 D50 D63 D86 F41; R24028 P0599 D01 D11
D10 D50 D63 D84 F41; L9999 L2404; H0260

002 017; ND03

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-265065

(43)公開日 平成7年(1995)10月17日

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F i	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21		8828-4B		
15/00				
C 1 2 P 7/62		7432-4B		
A (C 1 2 N 1/21				
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求	請求項の数5 F D (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-84084

(22)出願日 平成6年(1994)3月29日

(71)出願人 0000001941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72)発明者 塩見 尚史

兵庫県高砂市西畑1丁目13番2-303

(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 共重合体の合成遺伝子による形質転換体および共重合体の製造方法

(57)【要約】

【構成】 3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体の合成遺伝子を含むベクタープラスミドを宿主菌体内、特にアエロモナス属の菌体内に移入して得られる形質転換体、およびさらにβ-ケトチオラーゼ遺伝子および/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子が組み込まれたベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる形質転換体、並びにこれらの形質転換体を用いる該共重合体の製造方法。

【効果】 本発明の形質転換体および本発明の製造方法を用いることにより、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体を、安価な油脂や脂肪酸を原料に高収率で生産することができる。

3

源)を培地に添加する必要がないことから、安価なコストでの生産が期待された。しかしながら、アエロモナス属の菌株の特徴は脂肪酸の β -酸化経路の中間代謝物である3-ヒドロキシアシルCoAからポリエステル合成が進むルートがメインであり、 β -酸化の主生成物であるアセチルCoAが有効に利用されないことや、P(3HB-CO-3HHx)の合成酵素活性が低いことなどが原因となって、菌体内ポリエステル蓄積が抑制されることが明らかとなっている。従って、安価な天然油脂を炭素源として利用できても生産性が低く、炭素源収率も低いという課題が残されていた。従って、本発明の目的は、アエロモナス属菌のP(3HB-CO-3HHx)の合成酵素活性を高めるため、P(3HB-CO-3HHx)の合成酵素遺伝子等によって形質転換された形質転換体を提供することにある。また、本発明の他の目的は、かかる形質転換体を用いるP(3HB-CO-3HHx)等の共重合体を製造する方法を提供することにある。

[0005]

【課題を解決するための手段】本発明者は、アエロモナス属の菌株が優れたポリエステルを蓄積出来るにもかかわらず、菌体中の蓄積量と炭素収率が低いために工業的に利用できないという欠点に着目し、この菌体中の蓄積量と炭素収率を高めるため鋭意研究を行った。その結果、アエロモナス属のポリエステル合成に関与する遺伝子群を、適当な宿主に移入した形質転換体が、蓄積のポリエステルを合成し、炭素収率も非常に優れていることを発見し、さらに研究をすすめて本発明を完成するに至った。即ち、本発明の要旨は、(1) 3-ヒドロキシ/チレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体の合成遺伝子を含むベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる形質転換体、(2)

さらに β -ケトチオラゼ遺伝子および/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子が組み込まれたベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる

(1)記載の形質転換体、(3) 宿主菌がアエロモナス属の菌株であることを特徴とする(1)または(2)に記載の形質転換体、(4) ベクタープラスミドがpLA2917、pLA2905、pLA2910、pLA2901、pRK248、pRK290、pLAFR1、pVK100、pVK101、pVK102よりなる群から選択されるものであることを特徴とする(1)~(3)のいずれかに記載の形質転換体、並びに(5)

(1)~(4)のいずれかに記載した形質転換体を培養することにより、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体の製造方法、に関する。以下に本発明を詳細に説明する。

[0006] 1. 共重合体の合成遺伝子によって形質転換された形質転換体の取得方法

4

P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子によって形質転換された本発明の形質転換体を取得するためには以下の方法を探るのが便宜である。まず、P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株より遺伝子ライブラリーを作成し、次いでP(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子が欠損した合成能欠損変異株に入れ、最後にP(3HB-CO-3HHx)の合成能が回復した菌株を選別すれば、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子によって形質転換された本発明の形質転換体を得ることができる。

【0007】① P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株より遺伝子ライブラリーを作成するためには、P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株から染色体DNAを抽出精製し、制限酵素により切断した後に適当な長さのDNA断片を分離し、ベクタープラスミドと結合することにより得られる。

【0008】P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株とは、アエロモナス属の菌株であればいずれでもよく、例えば、アエロモナス キャピエ FA440株、アエロモナス ハイドロフィラ OL-338株などが挙げられる。

【0009】P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株より染色体DNAを抽出精製する方法としては、例えば、マーマー(Marmur)らの方法(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 3巻, 208頁, 1961年)が挙げられる。染色体を切断する際に用いる制限酵素は、ベクタープラスミドに対応する制限酵素であればいずれでもよく、宝酒造、ファルマシア、バイオラッド社などから容易に入手できる。また、切断されたDNA断片から適当な長さのDNAを抽出するが、ここで適当な長さとは、通常のベクターを用いるときは5000~20000塩基対程度、コスミドあるいはファージベクターを用いるときは15000~30000塩基対程度を意味する。DNA断片から適当な長さを取り出す方法としては、蔗糖密度勾配を用いる方法やアガロースゲルを用いる方法(モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 150頁, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)出版(1982年)参照)などいずれでもよく、例えば、RK2の複製に関与する領域を有するベクタープラスミド、例えば、pRK229、pRK248(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー, 141巻, 219頁, 1980年参照)、pRK290(プロシーディング・ナショナル・アカデミー・サイエンス・オブ・USA, 77巻, 7347頁, 1980年)、pLA2901、pLA2905、pLA2910、pLA2917(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー, 161巻, 955頁, 1985年参照)、pLAFR1(ジーン(Gene), 18巻, 289頁, 1982年参照)、pVK100、pVK10

7

年参照)により形質導入できる。炭素数6以上の油脂関連物質を唯一の炭素源としてP(3HB-CO-3HHx)を合成できる培地は、既に記載した合成能欠損変異株を取得する場合の培地と同一でよく、P(3HB-CO-3HHx)の合成の有無を調べる方法も、既に記載した合成能欠損変異株を取得する場合に使用した方法と同じでよい。

【0017】また、 β -ケトチオラーゼは、アセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成し、アセトアセチルCoAリダクターゼは、アセトアセチルCoAから β -ヒドロキシブチルCoAを合成する。この β -ヒドロキシブチルCoAは、P(3HB)合成のための3HBのモノマーユニットである。従って、 β -ケトチオラーゼおよび/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ活性の低い菌体では、菌体が炭素源を代謝する過程で多量に合成されるアセチルCoAを、P(3HB-CO-3HHx)合成の3HBのモノマーユニットとして十分に使えない。これに対し、P(3HB-CO-3HHx)合成遺伝子の他に、 β -ケトチオラーゼおよび/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子が導入された形質転換体は、 β -ケトチオラーゼおよび/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ活性が上昇しており、アセチルCoAを、P(3HB-CO-3HHx)合成の3HBのモノマーユニットとして十分に使用できる。それゆえ、炭素数6以上の炭素源以外の物質を唯一の炭素源とし、空素源を制限した培地で培養した場合、P(3HB)を高濃度に蓄積することができる。これらの遺伝子は、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子に近接して存在している。それゆえ、既に記載した合成能修復株のなかには、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子を有し、且つ、 β -ケトチオラーゼおよびアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子を有していない形質転換体とP(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子を有し、且つ、 β -ケトチオラーゼ遺伝子とアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子の両方、あるいはその一方を有する形質転換体が存在する。

【0018】最後に、本発明の形質転換体を選別するには、合成能修復株を炭素数6以上の油脂関連物質以外の物質を唯一の炭素源とし、空素源を制限した培地で培養した後、重合体(3HB)を高濃度に蓄積している菌株を選択すればよい。炭素数6以上の油脂関連物質以外の炭素源としては、糖類、例えば、グルコース、サッカロース、マルトース、フラクトース、ガラクトース、でんぷん、でんぷん加水分解物など、低級アルコール類、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ソルノールなど、グリセリン、有機酸類、例えば、酢酸、アセト酢酸、クエン酸、コハク酸、酒石酸、乳酸、グルコン酸などが挙げられる。

【0019】蓄積量を調べる方法は、既に記載した方法でよく、例えば、スダンブラックBにより染色する方

8

法、顕微鏡により蓄積を調べる方法などいずれでもよいし、ポリマーを回収し重量を測定する方法、例えば、培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄し、滅菌乾燥して得られる乾燥菌体をクロロホルム等を用いて、抽出処理し、遠心分離後、濾過等により菌体成分を除去後、抽出液にメタノールを加えて共重合体を沈殿回収する方法でもよい。さらに、形質転換体について直接 β -ケトチオラーゼおよびアセトアセチルCoAリダクターゼ活性を測定してもよい(例えば、セニア(Senior)らの方法、バイオケミカル・ジャーナル(Biochemical Journal), 125巻, 55頁, 1971年参照)。

【0020】アエロモナス属の菌株を宿主とした場合の形質転換体は、宿主内に入れられたベクタープラスミド上の遺伝子の大部分は、多コピー数が染色体内に挿入される。それゆえ、P(3HB-CO-3HHx)の生産には、これらの形質転換体を直接使用することができる。

【0021】また、P(3HB-CO-3HHx)をアエロモナス属以外の菌株で生産することも可能である。この場合、例えば、形質転換体よりプラスミドを抽出精製したものを、大腸菌に入れた後、プラスミドを精製し、プラスミドをそのまま、あるいは、目的の宿主で発現可能なベクターに連結しなおした後、目的の宿主にプラスミドを入れればよい。

【0022】アエロモナス属からのプラスミドの精製および大腸菌からのプラスミドの精製方法は、通常の方法でよく、例えば、アルカリ法(メソーズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 100巻, 243頁, 1983年発刊)が使用できる。また、大腸菌や目的の宿主にプラスミドを入れる方法は、既に述べた合成能欠損変異株へ遺伝子ライブラリーを形質転換した時と同じ方法、例えば、塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、低pH法など、コスミドベクターやファージベクターを利用する場合の形質導入法例えば、市販のin vitroパッケージキットを用いる方法など、接合法などが挙げられる。

【0023】目的の宿主としては、炭素数6以上の油脂関連物質を代謝できる微生物であればいずれでもよく、バクテリアとして、グラム陰性バクテリア、例えば、エシコリヒア(Escherichia)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、アルカリゲネス属(Alcaligenes)、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、ビブリオ(Vibrio)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、リゾビウム(Rhizobium)属、グルコノバクター(Gluconobacter)属など、グラム陽性バクテリア、例えば、バシルス(Bacillus)属、クロストリジウム(Clostridium)属、ラクトバシルス(Lactobacillus)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、アルスロバクター(Arthrobacter)属、ストレプトコッカス(Streptococcus)属など、また放線菌として、ストレ

本生物工学会編(培風館出版)参照)を施し、変異を行った。そして、1プレート当たりコロニーが約100個になるようにMM(0.5%グルコース、0.01%硫酸マグネシウム、0.3%磷酸ニカリウム、0.7%磷酸一カリウム、0.1%硫酸アンモニウム、0.01%イーストエキス、pH7.0)寒天培地に菌体懸濁液を塗布し、30℃で5日間インキュベートした。得られたコロニー10000個に対して、MM寒天培地と、MPA(0.15%ハルミチン酸、0.01%硫酸マグネシウム、0.7%リン酸ニカリウム、0.3%リン酸一カリウム、0.1%硫酸アンモニウム、0.01%イーストエキス、1ml/100mlトリトンX-100)寒天培地と、MNP(0.15%ハルミチン酸、0.01%硫酸マグネシウム、0.7%リン酸ニカリウム、0.3%リン酸一カリウム、0.01%硫酸アンモニウム、0.01%イーストエキス、1ml/100mlトリトンX-100、pH7.0)寒天培地とに、それぞれのコロニーをレプリカした。そして、MNP寒天培地のプレートを30℃で5日間インキュベートした後、スダンブラックB法により、ポリエステルを染色した。即ち、200mg/リットルのスダンブラックBを含む95%のエタノール溶液を10mlずつ各プレートに注ぎ、30分間放置した後、溶液を除去し、95%のエタノール溶液で1回プレートを洗浄した。その結果、MM培地とMPA培地で増殖し、且つ、MNP培地で青色に染色されていないコロニーを5個得た。それらを位相差顕微鏡(オリンパスBH2、1000倍)で観察し、ポリエステルが蓄積していないことを確認した。これら、ポリエステル合成遺伝子の欠損株(合成能欠損変異株)のひとつをAC004と呼ぶ。

【0031】実施例2

次に、アエロモナスの遺伝子ライブラリーを作成した。アエロモナス キャビエ FA440株を200mlのLB培地(1%イーストエキス、0.5%バクトペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%グルコース、pH7.2)中、30℃で一昼夜培養した後、10000rpmで10分間遠心分離することにより集菌した。そして、この菌体を0.01Mのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-0.001Mのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液(以下TE溶液と呼ぶ)50mlに懸濁し、50mgの塩化リゾチームを添加した後、4℃で30分間放置した。さらに、50mlの1%のラウリル硫酸ナトリウムを含有するTE溶液を添加し、70℃で20分間放置した。この液を室温まで冷却後、100mlのフェノール-クロロホルム溶液(容量比1:1)を添加して静かに攪拌した後、10000rpmで10分間遠心分離し、上澄みをバスツールピペットで静かに取り出した。そして、フェノール-クロロホルム溶液(容量比1:1)の代わりに、100mlのクロロホルム溶液を用いて同様の操作を行い、上澄みをバスツ

ルピペットで静かに取りだし、ピーカーに入れた。この上澄み液に、20℃に冷却したエタノールを少しずつ添加しながら、析出してきた染色体DNAをガラス棒で巻き取るにより、アエロモナス キャビエFA440の染色体DNAを得た。

【0032】得られた染色体DNAを、制限酵素Sma3AIで部分分解した後、透析チューブ法(モレキュラー クローニング(Molecular cloning)、164頁、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory) 出版参照)により、5~15キロ塩基対のDNA断片を分離精製した。他方、ベクタープラスミドは、アエロモナス属で発現可能なpLA2917を使用した。このプラスミドを制限酵素BglIIで切断し、脱磷酸化処理(モレキュラー クローニング(Molecular cloning)、133頁、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory) 出版参照)を施した後、精製した染色体DNA断片(遺伝子ライブラリー溶液と呼ぶ)と連結した。

【0033】形質転換は、塩化カルシウム法を用いて行った。即ち、大腸菌DH1株を1mlのLB培地に一口金耳接種し、37℃で一昼夜振盪培養した。そして、0.05mlの培養液を5mlのLB培地に入れ、37℃でさらに2時間培養した。その後、培養液を10000rpmで10分間遠心分離して菌体を回収した後、0.1ml/1の塩化カルシウム溶液2mlに懸濁して4℃で2時間放置した。その後、再び10000rpmで10分間遠心分離して菌体を回収した後、0.1ml/1の塩化カルシウム-0.01mol/lのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン溶液0.2mlに懸濁し、遺伝子ライブラリー溶液0.01mlを添加し、さらに45分間放置した。そして、42℃で2分間放置した後、1.8mlのLB培地を添加して37℃でさらに2時間放置し、この菌体を集菌した後に25mg/mlのテトラサイクリンを含有するLB寒天培地上に塗布し、37℃で24時間インキュベートした。その結果、10⁴個程度のテトラサイクリンに耐性を示すコロニーが得られた。得られたテトラサイクリンに耐性を示すこれらのコロニーよりアルカリ法(メソーズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、100巻、243頁、1983年発行)を用いて、プラスミドを粗精製した後、超遠心分離法(モレキュラー クローニング(Molecular cloning)、150頁、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory) 出版)を用いてプラスミドの精製を行った。このようにして、精製された遺伝子ライブラリーを得た。

【0034】実施例3

アエロモナスの菌株として、実施例1で取得したアエロモナス キャビエ(Aeromonas caviae)AC004株の抗生物質に対する耐性を調べたところ、テトラサイクリン、カナマイシンに感受性であり、アンピシリンには耐

15

16

炭 素 源	使用菌株	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含量 (g/g 乾燥菌体)	ポリエステル組成 C8/C4(mol/mol)
グルコース	FA440	0.491	0.00	測定不能 ^{a)}
	AC004	0.430	0.00	測定不能 ^{a)}
	AC118	0.394	0.20	0.00
パルミチン酸	FA440	0.736	0.08	0.17
	AC004	0.730	0.00	測定不能 ^{a)}
	AC118	0.742	0.60	0.05

a) ポリエステルがほとんど合成されていないため測定できなかった。

【0039】実施例4

アエロモナス キャビエ FA440、AC004、AC118を10mlのLB培地（AC118はテトラサイクリンを含有したLB培地）の入った三角フラスコ中30℃で24時間振盪培養した。その後、それぞれの菌を集菌して1mlの生理食塩水に懸濁したものを、100mlのMNP培地に入れ、30℃で48時間振盪培養した。得られた培養液中1mlを遠心分離して菌体を集め、位相差顕微鏡により、菌体の蓄積状況を調べた。残り99mlより得られた菌を集め、実施例3と同様の方法でポリエステルを精製し、分析した。得られた結果を表1（下側）に示す。

【0040】親株であるFA440株では、ポリエステル含量及びポリエステル収率が非常に低いのにに対し、AC118株では、ポリエステル含量が60%にも到達し、ポリエステル収率も著しく改善された。そして、本実験で得られたポリエステル含量は、アルカリゲネスユートロファスを用い、炭素源として炭素数が奇数個のカルボン酸を与えてP(3HB-CO-3HV)を得る方法よりも高い含量を得るものであるばかりか、非常に

安価な油脂類似物質を炭素源にするために、生産コストの面からも極めて優れた方法であることが判明した。

【0041】なお、本実施例で使用したアエロモナスキャビエ FA440株は、工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に平成3年6月11日付けで寄託されており、寄託番号は、微工研条寄第BP-3432号である。また、本実施例で得られたアエロモナスキャビエ AC118株は、工業技術院生命工学工業技術研究所（生命研）に平成6年2月2日付けで寄託されており、寄託番号は、生命研条寄第BP-4544号である。さらに、プラスミドpLA2917は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）の寄託番号37355としてそれぞれ分譲された。

【0042】

【発明の効果】本発明の形質転換体および本発明の製造方法を用いることにより、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体を、安価な油脂や脂肪酸を原料に高収率で生産することができる。

フロントページの続き

(5)Int.Cl.

識別記号 弁内整理番号

F1

技術表示箇所

C12R 1:01

C12P 7:02

C12R 1:01